

HERPÈSVIROSES DES ÉQUIDÉS : INTÉRÊTS ET LIMITES DES OUTILS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

EQUINE HERPESVIRUS DISEASES: RELEVANCE AND LIMITS OF MOLECULAR TOOLS

Par Stéphane PRONOST⁽¹⁾, Erika HUE, Loïc LEGRAND, Pierre-Hugues PITEL, Guillaume FORTIER.
(Communication présentée le 3 novembre 2011)

RÉSUMÉ

Au moins cinq herpèsvirus équins peuvent infecter le cheval : trois alpha-herpèsvirus (les herpèsvirus 1, 3 et 4) et deux gamma-herpèsvirus (les herpèsvirus équins 2 et 5). L'herpèsvirus équin 1 est responsable de trois formes cliniques : une forme respiratoire, une forme abortive et une forme neurologique. Cette dernière, plus connue sous le nom de myéloencéphalopathie à HVE-1, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. La plupart des travaux ont porté sur la relation entre la présence d'une mutation dans l'ORF 30 codant l'ADN polymérase et l'expression de la forme paralytique. Si cette mutation semble jouer un rôle, d'autres facteurs liés à l'hôte et à l'environnement participent certainement au développement de la maladie. L'herpèsvirus équin 4 est plus connu sous le nom de virus de la rhinopneumonie et est responsable d'une part importante des affections respiratoires chez les jeunes poulains. L'herpèsvirus équin 3 est responsable de l'exanthème coïtal équin et l'on sait aujourd'hui qu'il peut se transmettre par les voies respiratoires. Les herpèsvirus équins 2 et 5 sont associés aux maladies respiratoires subcliniques du cheval athlète même si leur rôle reste à préciser, leur découverte sur l'ensemble des continents étant relativement récente. Le développement des outils de génétique moléculaire a permis de faire des progrès importants dans la détection de ces virus même si un challenge demeure : différencier les formes latentes des formes infectieuses. Si comme pour d'autres virus équins (ex : grippe, artérite virale équine), des travaux sont réalisés pour typer les différentes souches responsables de différentes formes d'expression de la maladie, il n'existe toujours pas de consensus international sur un arbre phylogénique pour aucun de ces cinq herpèsvirus équins. Le suivi et la caractérisation des différentes souches d'HVEs sont très certainement l'autre défi de demain.

Mots-clés : cheval, herpèsvirus, HVE, PCR, typage.

(1) Laboratoire Frank Duncombe, Pôle Recherche et Développement – 14053 CAEN cedex 4
Courriel : stephane.pronost@calvados.fr

SUMMARY

At least five equine herpesviruses are known to infect horses: three alpha herpesviruses (equine herpesvirus-1, -3 and -4) and two gamma herpesviruses (equine herpesvirus-2 and -5). Equine herpesvirus-1 is responsible for three clinical presentations: respiratory, abortigenic and neurological. This latter, widely known as EHV-1 associated, myeloencephalopathy has been thoroughly investigated over the past years. Most of the studies focused on the relation between the presence of a mutation in ORF 30 coding for DNA polymerase and the expression of the paralytic (neurological) form. Even if this mutation seems to play a role, other factors related to the host and the environment are certainly involved in the development of the disease. Equine herpesvirus-4 is better known as the rhinopneumonia virus and is responsible for a large part of respiratory disorders in young foals. Equine herpesvirus-3 is responsible for equine coital exanthema, whose transmission through the respiratory tract is now proven. Equine herpesvirus-2 and -5 are associated with subclinical respiratory diseases in equine athletes, even though their pathogenic role has yet to be clarified as they were detected in all continents only relatively recently. The development of molecular genetic tools lead to major progress in the detection of these viruses, but the differentiation between latent and infectious forms is still unresolved. Although studies are currently performed on the typing of strains responsible for different clinical presentations involving equine herpesviruses as well as in other equine viruses (influenza, equine viral arteritis), there is no international consensus on a phylogenetic tree for any of the 5 equine herpesviruses. Further studies are definitely required to monitor and characterise the different strains of EHV.

Key words: horse, herpesvirus, EHV, PCR, typing.

INTRODUCTION

Les infections herpétiques chez le cheval sont remarquées tant par la variabilité de leurs manifestations cliniques que par la diversité des virus impliqués. Leur diagnostic a été favorisé par le développement de méthodes adaptées d'analyse biologique: techniques immuno-enzymatiques de détection (ELISA), techniques de mise en évidence du virus (isolement sur cultures cellulaires, réaction d'immunofluorescence sur des cryocoups d'organes ou techniques d'amplification de gènes (PCR). Si jusqu'en 1981, l'herpèsvirus 1 (HVE-1) et l'herpèsvirus 4 étaient considérés comme deux sous-types d'un même virus, il est bien établi aujourd'hui qu'il s'agit de deux virus différents (Crabb & Studdert, 1995). Cette différence n'a pas toujours été facile à objectiver par les signes cliniques ou les tests classiques de laboratoire mais les progrès des techniques de génétique moléculaire et, en particulier, de la technique de PCR, ont permis une nouvelle classification de ces virus sur la connaissance de leur génome. Ces techniques sont également appliquées à la détection des herpèsvirus 2 et 5, à l'identification et au suivi de l'herpèsvirus 3 responsable de l'exanthème coïtal. Elles ont permis une réelle évolution dans la détection des herpèsvirus et le diagnostic de l'herpèsvirose équine mais l'interprétation des résultats suscite toujours quelques interrogations.

Cet article a d'abord pour objectif de présenter les différents herpèsvirus équins en consacrant une place privilégiée à HVE-1 car il demeure responsable des pertes économiques les plus importantes ; ce virus est également celui pour lequel les données de la littérature sont les plus fournies, en particulier sur les myéloencéphalopathies. Compte tenu de l'importance des

méthodes biologiques à la fois pour le diagnostic des herpèsvirus et pour une meilleure connaissance des virus et de leur phylogénie, nous consacrerons la seconde partie à l'intérêt et aux limites des outils de la génétique moléculaire pour leur étude.

LES HERPÈSVIRUS ÉQUINS

À ce jour, neuf herpèsvirus ont été décrits chez les équidés : les HVE-1 à 5 infectent les chevaux ; les 6 à 8, les ânes et HVE-9, le zèbre (**tableau 1**). L'HVE-1 est communément appelé virus abortif équin et l'HVE-4, virus de la rhinopneumonie équine. Une confusion règne encore aujourd'hui car l'HVE-1 n'est pas seulement responsable d'avortements mais également de formes respiratoire et nerveuse de la maladie. De même, l'HVE-3, connu pour son tropisme génital, peut être aussi responsable de la forme respiratoire (Barrandeguy *et al.* 2010b).

L'herpèsvirus équin 1

Structure

L'herpèsvirus équin 1 est composé d'une nucléocapside icosaédrique qui renferme le génome viral et est entourée par une enveloppe amorphe constituée de plusieurs glycoprotéines. La majorité des protéines d'HVE-1 présentent une forte homologie avec celles de l'herpèsvirus simplex humain (HSV) qui est le prototype de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Les particules virales ont une dimension comprise entre 160 et 200 nm de diamètre. Le génome de la souche Ab4 du virus HVE-1, purifié à partir d'une plaque de lyse, a été complètement séquencé

Hôte naturel	Désignation	Sous famille (genre)	Lié à	Autre désignation
Cheval	Herpèsvirus équin 1 (HVE-1)	<i>Alphaherpesvirinae</i> (<i>Varicellovirus</i>)	/	Virus abortif équin
	HVE-2	<i>Gammapherpesvirinae</i> (<i>Percavirus</i>)	/	
	HVE-3	<i>Alphaherpesvirinae</i> (<i>Varicellovirus</i>)	/	virus de l'exanthème coïtal
	HVE-4	<i>Alphaherpesvirinae</i> (<i>Varicellovirus</i>)	/	Virus de la rhinopneumonie équine
	HVE-5	<i>Gammapherpesvirinae</i> (<i>Percavirus</i>)	/	
	HVE-6	<i>Alphaherpesvirinae</i>	HVE-3	Herpèsvirus Asin 1
Âne	HVE-7	<i>Gammapherpesvirinae</i>	HVE-2 et 5	Herpèsvirus Asin 2
	HVE-8	<i>Alphaherpesvirinae</i> (<i>Varicellovirus</i>)	HVE-1	Herpèsvirus Asin 3
	HVA-4	<i>Gammapherpesvirinae</i>	HVE-2 et 5	Herpèsvirus Asin 4
	HVA-5	<i>Gammapherpesvirinae</i>	HVE-2 et 5	
Zèbre et Gazelle	HVE-9	<i>Alphaherpesvirinae</i> (<i>Varicellovirus</i>)	HVE-1	

Tableau 1 : Herpèsvirus des équidés (d'après Fortier et al. 2010).

(Telford et al. 1992). Il est composé d'un ADN double brin, divisé en deux régions uniques, longue (UL) et courte (US). Séquencé, il comprend 150223 pb et contient 80 cadres de lecture ouverts (ORFs pour *open reading frame*) qui codent 76 gènes uniques ; quatre ORFs sont dupliqués dans la séquence TRS (transcription-regulating sequence) (Telford et al. 1992 ; Crabb & Studdert, 1995). Le génome viral est enfermé dans une nucléocapside composée de six protéines (Perdue et al. 1974). Comme pour l'ensemble des herpèsvirus, la nucléocapside est formée de 162 capsomères constitués de 12 pentons et 150 hexons. Douze protéines forment un portail d'entrée de l'ADN viral dans la capsid (Perdue et al. 1974). Le tégument correspond à l'espace qui sépare la nucléocapside de l'enveloppe. Il est composé de 12 protéines et enzymes impliquées dans le déclenchement de la réplication. L'enveloppe présente onze glycoprotéines virales à sa surface : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM et gN. Elles sont essentielles pour l'adsorption, la pénétration du virus et sa dissémination par contact cellulaire.

Propagation du virus et différentes formes de la maladie

L'HVE-1 est transmis par inhalation ou, après un avortement, par contact direct avec des éléments infectés comme le fœtus ou les annexes fœtales; mais des transmissions par voie iatrogène ont également été décrites. Un animal peut potentiellement contaminer ses congénères par les voies respiratoires au delà d'une distance de cinq mètres (Pusterla & Mapes, 2008). La dissémination du virus emprunte ensuite des voies impliquant plusieurs types cellulaires (Kydd et al. 1994).

Infection des voies respiratoires et phase de virémie

Le processus d'infection par l'HVE-1 a été bien décrit lors d'une infection expérimentale par la souche Ab4 (Kydd et al. 1994). En l'absence d'anticorps neutralisants dans le mucus, les cellules épithéliales des muqueuses nasale et nasopharyngienne sont infectées (**figure 1**). Il s'ensuit une phase de multiplication du virus, une érosion due à la nécrose des cellules épithéliales et une réponse inflammatoire. L'HVE-1 se propage alors rapidement dans l'organisme. Les leucocytes proches de la *lamina propria* et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques sont également infectés par ce phénomène de propagation de cellule à cellule. Le virus est détecté dans l'épithélium respiratoire dès 12 heures après l'infection et dans le sang, au cours des deux à quatre jours suivants (Kydd et al. 1994). Chez les jeunes chevaux, les signes cliniques se manifestent par de la fièvre, un jetage nasal visqueux et mucopurulent et, occasionnellement, par de la toux et une lymphadénopathie. Si l'infection par l'HVE-1 affecte d'abord les voies respiratoires supérieures, le virus peut disséminer jusqu'aux voies respiratoires profondes *via* les vaisseaux sanguins et, dans certains cas, atteindre le poumon et provoquer une bronchopneumonie (Crabb & Studdert 1995). Chez le cheval adulte, l'infection respiratoire est souvent très modérée et passe la plupart du temps inaperçue.

Quand les leucocytes sont infectés et la virémie établie, l'HVE-1 se propage rapidement dans l'hôte. Dès 12 à 24 heures après l'infection, il est détecté dans les nœuds lymphatiques submandibulaires, rétropharyngiens et bronchiques. Il subit vraisemblablement une phase d'amplification dans différents types cellulaires comme les leucocytes mononucléés, les macrophages et les cellules endothéliales (Kydd et al. 1994). Sa circulation

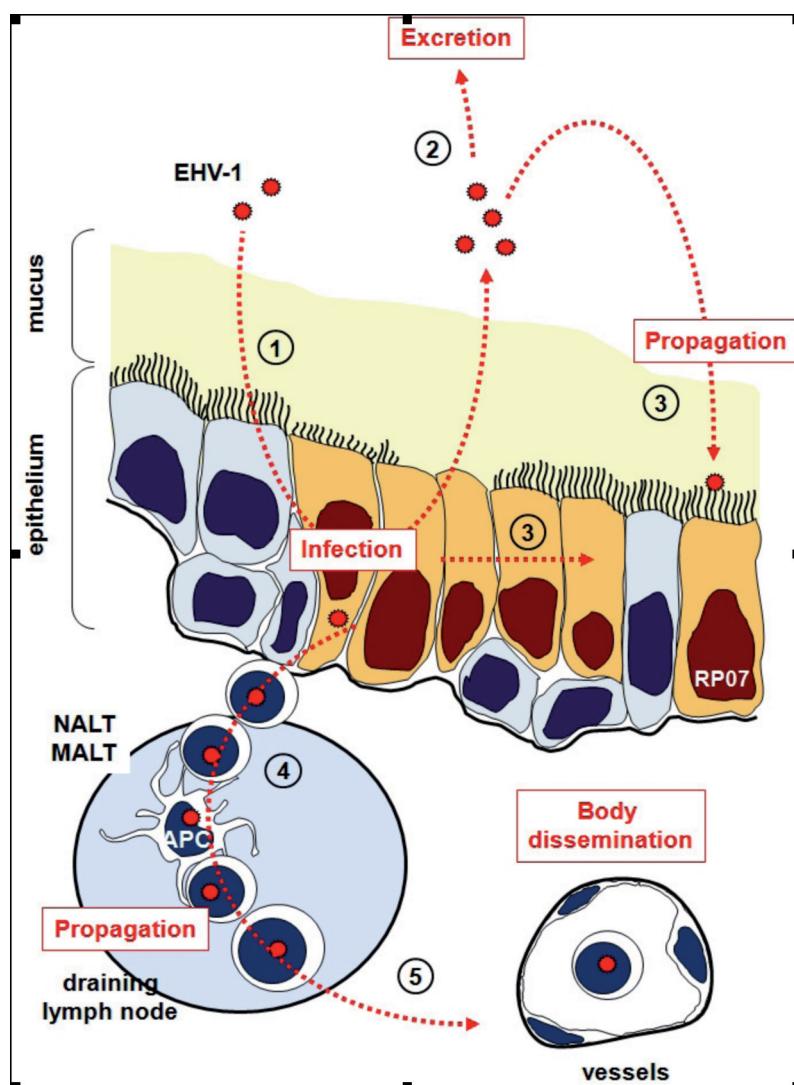


Figure 1 : Différentes phases de l'infection par l'HVE-1 dans la muqueuse des voies respiratoires supérieures (Paillot et al. 2009).

1. Infection des cellules épithéliales ; 2. Réplication et dissémination du virus ; 3. Dissémination de cellule à cellule ; 4. Infection des cellules mononucléées sanguines via les nœuds lymphatiques ; 5. Phase de virémie : le virus peut atteindre le tractus génital des juments et le système nerveux central.

dans ces compartiments permet une dissémination dans tout l'organisme jusqu'à des endroits éloignés du point d'infection comme l'utérus chez la jument ou le système nerveux central.

Avortement et mortinatalité

La dissémination de l'HVE-1 jusqu'au tractus génital chez la jument conduit à un avortement et HVE-1 est aujourd'hui reconnu comme la cause majeure d'avortement d'origine virale dans cette espèce (Allen & Bryans, 1986 ; Léon 2008 ; Chaffaux 2011 ; Laugier 2011). L'infection de la jument gestante peut se traduire par un avortement généralement tardif, dans les derniers mois de la gestation, une mortalité néonatale ou la naissance de poulains prématurés. Après une primo-infec-

tion, l'HVE-1 peut être encore la cause d'avortement même des mois ou des années plus tard et à l'opposé, un avortement consécutif à l'infection par HVE-1 ne compromet pas de futures naissances. L'infection des cellules endothéliales de l'endomètre peut induire une thrombose et une ischémie dans les micro-cotylédons du placenta. Il en résulte une séparation prématurée du placenta et de l'endomètre conduisant à la mort du fœtus par anoxie. Le virus peut également être transmis au fœtus et se propager dans ses organes, provoquant des lésions macroscopiques, voire microscopiques.

Forme neurologique de la maladie

Le premier cas de myéloencéphalopathie à herpèsvirus (EMH) a été décrit par Saxegaard (1966). Depuis, plusieurs épisodes ont été rapportés et les différents signes cliniques caractéristiques décrits : l'ataxie temporaire, la parésie, l'incontinence urinaire, mais aussi une paralysie complète pouvant conduire à la mort de l'animal (Slater *et al.* 2006). Il est essentiel d'éviter que l'animal ne se couche pour favoriser ses chances de récupération (*figure 2*). Le virus infecte les animaux par les voies respiratoires et après une première phase de multiplication dans les cellules épithéliales, une phase de virémie achemine le virus jusqu'au système nerveux central. La phase d'incubation, en conditions expérimentales ou lors d'infections par les voies naturelles, varie de six à huit jours (Crabb & Studdert, 1995). Contrairement au HSV, l'HVE-1 n'est pas considéré comme un virus neurotrope chez le cheval et les lésions histologiques vasculaires observées dans les tissus nerveux sont responsables d'hémorragie, de thrombose, d'hypoxie et conduisent secondairement à une dégénérescence du tissu nerveux

consécutif à l'ischémie (Allen & Bryans, 1986). Une infection par voie rétrograde à partir des ganglions trigéminaux (ganglions de Gasser) n'est pas totalement exclue compte tenu de l'importance de ces sites où le virus demeure à l'état latent (Borchers *et al.* 2006a). La présence d'HVE-1 a été démontrée par immunohistochimie dans les cellules du ganglion lors d'infections expérimentales chez des poneys SPF (*specific pathogen free*) et dans un modèle murin (Hasebe *et al.* 2002).

Il est difficile de savoir s'il faut classer les myéloencéphalopathies dans les formes rares des maladies par HVE-1. Une réelle augmentation des cas est rapportée par Goehring *et al.* (2006) et Henninger *et al.* (2007), qui a conduit l'USDA en 2007 à classer l'EMH comme maladie résurgente². Toutefois, plus

(2) http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/ehv1final.pdf

récemment, Goehring *et al.* (2010), suggèrent de rester prudents, face à une recrudescence apparente de la maladie, qui peut n'être qu'une surestimation traduisant le regain d'intérêt des praticiens pour le sujet.

Les formes nerveuses de la maladie peuvent être graves et les cas, sporadiques ou associés à des épizooties. (Friday *et al.* 2000; Goehring *et al.* 2006 ; Henninger *et al.* 2007). Elles ont été décrites aussi bien sur des champs de course, dans des haras que dans des écoles d'équitation ou des hôpitaux vétérinaires. Une étude rétrospective de quatre années, réalisée en Hollande, a montré que les épizooties survenaient surtout entre la mi-novembre et la mi-mai (Goehring *et al.* 2006). D'autres facteurs de risque comme la race, l'âge, le sexe et l'apparition de fièvre ont été identifiés (Lunn *et al.* 2009). La fréquence des EMH est plus élevée chez les trotteurs et les chevaux lourds et aucun cas n'a été décrit chez les poneys Fjord, les Haflingers ou les chevaux islandais. Les chevaux âgés et les femelles sont plus susceptibles de développer la maladie (Goehring *et al.* 2006) et aucun cas n'a été rapporté chez les chevaux âgés de moins de trois ans.

L'épidémiologie de l'EMH comporte beaucoup d'inconnues et la connaissance des facteurs de risques qui lui sont associés est encore lacunaire. Aussi, en l'absence d'une vaccination efficace, la prévention demeure-t-elle le meilleur moyen de protection contre la maladie.



Figure 2 : Cheval atteint d'EMH maintenu par des sangles pour éviter qu'il ne se couche et pour favoriser la récupération (Cliché P. Tritz).

La latence

Après l'infection des voies respiratoires et la phase de réplication virale, s'ensuit le développement d'une autre phase stratégique pour la survie du virus dans l'organisme : la phase de latence. Les sites de latence d'HVE-1 sont les ganglions trigéminaux et les tissus lymphoïdes associés à l'appareil respiratoire. (Slater *et al.* 1994). La persistance du virus chez des chevaux infectés en l'absence de signes cliniques constitue un réel risque pour l'élevage. La réactivation du virus à l'état latent peut être à l'origine de maladie pour l'animal porteur mais également pour les animaux qui sont à son contact. Entre deux épisodes de réactivation, les leucocytes infectés par des virus latents ne sont pas reconnus par le système de défense immunitaire. La réactivation peut intervenir à la suite d'un stress induit, par exemple, par la castration, le transport, le sevrage ou par des traitements médicamenteux comme les corticostéroïdes. Au cours de la phase de latence, l'expression du génome d'HVE-1 est réprimée, seul l'ARN viral LAT (*latent-associated transcript*) est transcrit à partir du gène IE. La fonction exacte des LATs n'est pas bien comprise.

Prévention et gestion des foyers en cas d'infection

Lorsqu'un cas est détecté dans un élevage ou sur un champ de course, il est essentiel d'éviter la propagation du virus. Les moyens de lutte les plus efficaces consistent à le contenir à son foyer d'origine par des mesures d'isolement, de quarantaine et à l'éliminer par des traitements, des tests biologiques ciblés permettant de vérifier sa dissémination.

Les trois éléments suivants sont des facteurs de succès :

- la précocité de la détection du virus, en utilisant les outils de diagnostic qu'offre la biologie moléculaire (cf chapitre2) ;
- la prophylaxie sanitaire et l'interruption de la chaîne de transmission : il s'agit d'éviter la dissémination du virus par le personnel (mains, vêtements,...) ou le matériel contaminé (litière, licol, instruments médicaux,...). Le facteur essentiel et constant doit être l'augmentation de la surveillance : prise de la température corporelle, détection des premiers des signes cliniques. Il est également possible de soumettre à un diagnostic biologique l'ensemble des animaux potentiellement en contact avec l'animal malade, pour déterminer l'étendue de l'exposition et évaluer le risque épidémique. La prévention du phénomène de réactivation doit également être prise en compte en minimisant les différents facteurs de stress. La quarantaine est une des options souvent mises

COMMUNICATION

en place pour lutter contre la dissémination de la maladie, même si les modalités varient. Un des objectifs des études futures est de tenter d'harmoniser ces mesures tout en conciliant maintien de l'activité économique, des courses en particulier, et contrôle du risque de dissémination de la maladie. Dans la majorité des cas, deux tests négatifs réalisés à partir de prélèvements de sang total et d'écouillons nasopharyngés à deux jours d'intervalle sont requis pour lever la quarantaine ;

- la prophylaxie médicale : des traitements par des antiviraux comme l'acyclovir®, la famciclovir® et le penciclovir® ont été réalisés à titre expérimental mais leur efficacité doit encore être démontrée chez le cheval. Un traitement par les antibiotiques est souvent administré pour éviter les surinfections. Le praticien doit s'interroger, au cas par cas, sur l'emploi de corticoïdes, car ils sont aussi, à forte dose, de puissants réactivateurs de virus.

Brève description d'une épidémie survenue dans un centre équestre en 2009 en France

L'épisode, que nous rapportons, concerne un centre équestre qui héberge 66 chevaux dont sept ont présenté des symptômes neurologiques. Des analyses ont été réalisées sur des prélèvements sanguins et des écouillons nasaux à l'aide la technique d'amplification génique (PCR) ou de techniques de mise en évidence directe du virus. Les sept cas se sont déclarés entre le 14 et le 28 juillet 2009 ; les chevaux, âgés de 12 à 22 ans, ont présenté de la fièvre, de l'incontinence mais également du jetage et de la toux, puis des signes d'ataxie 48 heures après le pic de fièvre. Les prélèvements de sang ou sur écouillon nasal ont donné des signaux positifs pour HVE-1 chez six chevaux. Cinq chevaux ont dû être euthanasiés et les deux autres ont récupéré respectivement après sept et 16 semaines. L'autopsie menée chez l'un de ceux euthanasiés a révélé les lésions caractéristiques des formes d'EMH et le virus a été détecté par la technique de PCR dans tous les tissus analysés. Nous avons isolé le virus par culture cellulaire et son génotypage a montré qu'il s'agissait de la souche « neuropathogène ». Les premières mesures d'isolement prises dès le début des symptômes et la quarantaine mise en place dès l'obtention des premiers résultats de laboratoire ont permis de contenir l'épidémie. Si l'on considère le taux de mortalité comme un critère de gravité de l'épidémie, cet épisode est l'un des plus importants décrits ces dix dernières années.

Les autres herpèsvirus équins

Quatre autres virus (HVE-4, HVE-3, HVE-2 et HVE-5) infectent aussi les chevaux et sont responsables de différentes formes de maladie

L'herpèsvirus équin 4

L'HVE-4, dont le génome est proche de celui de l'HVE-1, est responsable de formes respiratoires, observées essentiellement chez les jeunes poulains depuis le sevrage jusqu'à l'âge de deux ans. Les sites de latence d'HVE-4, comme pour l'HVE-1

(*Alphaherpesvirinae*) sont les ganglions trigéminaux et les tissus lymphoïdes associés à l'appareil respiratoire. L'absence de données nouvelles depuis la publication de Fortier *et al.* (2003) justifie qu'il ne fasse pas l'objet d'un chapitre particulier. Nous précisons néanmoins qu'il continue à être détecté dans de rares cas lors d'avortements (Chaffaux *et al.* 2011, Laugier 2011).

L'herpèsvirus équin 3

L'herpèsvirus équin 3 est responsable de l'exanthème coïtal équin (ECE), caractérisé par la formation de papules, de vésicules, de pustules et d'ulcères sur le pénis et le prépuce chez l'étalon et sur la muqueuse vaginale, la muqueuse vulvaire et la peau périnéale chez la jument (Thiry 2006). L'ECE a été décrit pour la première fois au début des années 1900 et le virus ne sera isolé qu'en 1968 sur le continent américain. Bien que décrite dans de nombreux pays, cette maladie est considérée comme sous diagnostiquée : les signes cliniques caractéristiques, observés de deux à 10 jours après l'infection, sont bien connus des praticiens mais également des éleveurs, ce qui ne les incite pas à demander un diagnostic de confirmation.

L'HVE-3 peut exister sous une forme latente, qui peut être réactivée par un traitement par les corticostéroïdes (Barrandéguy *et al.* 2008), ce qui avait été supposé antérieurement (Burrows & Goodridge, 1984).

Les travaux plus récents du Dr Maria Barrandéguy (Barrandéguy 2010) ont donné un regain d'intérêt pour cette maladie. Une contamination respiratoire longtemps soupçonnée a été mise en évidence lors d'une épidémie de rhinite infectieuse (Barrandéguy *et al.* 2010a). L'observation d'une épidémie touchant 160 juments dans un important centre de transfert d'embryons souligne l'importance d'un risque de contamination iatrogène (Barrandéguy *et al.* 2010b), mais aussi la nécessité des mesures d'hygiène à prendre tant au niveau du personnel, du matériel que dans les méthodes d'élevage pour éviter la dissémination du virus.

Cette même équipe a aussi rapporté que, parmi des juments porteuses du virus mais ne présentant pas de signes cliniques, deux d'entre elles avaient présenté une phase de réactivation-réexcrétion après une période d'isolement de 11 mois (Barrandéguy, 2010c). Cette observation rejoint la démonstration, précédemment citée, de la réactivation expérimentale du virus à l'état latent. L'HVE-3, comme les autres herpèsvirus, peut donc être retrouvé à l'état latent, même si les sites de latence ne sont pas actuellement connus. Par comparaison avec l'herpèsvirus humain 2 et l'herpèsvirus caprin 1, l'HVE-3 pourrait demeurer latent dans les ganglions sacrés ou ischiatiques (Barrandéguy & Thiry, 2011).

Si pendant longtemps l'HVE-3 n'a pas été considéré comme l'un des herpèsvirus équins majeurs du point de vue des pertes économiques, d'une part l'ensemble de ces travaux et d'autre part, l'augmentation des échanges internationaux (semence, embryons, chevaux) montrent la nécessité d'une surveillance efficace pour éviter une recrudescence des cas. L'ensemble de

ces données justifie amplement l'inscription de l'herpèsvirose de type 3 dans le *Code of Practices 2010 du Horse Betting Levy Board*³.

Les *Gammaherpesvirinae* : HVE-2 et HVE-5

Cette famille de virus a tout d'abord fait l'objet de premiers travaux importants dans l'hémisphère sud ; pourtant la première souche codifiée sous le sigle LK et devenue souche de référence pour l'HVE-2 provenait d'un poulain malade qui avait présenté des signes respiratoires au Royaume-Uni. Une assez grande confusion a ensuite régné car d'une part, ces virus furent longtemps assimilés aux cytomégalovirus humains et d'autre part, considérés comme des virus « sans réelle maladie associée » en raison de leur isolement fréquent chez des chevaux sains (Fortier *et al.* 2010). Dans les années 1990, les méthodes de caractérisation des génomes ont permis de distinguer l'HVE-2 de l'HVE-5 (Agius & Studdert, 1994).

Aujourd'hui, l'HVE-2 est considéré comme le chef de file du genre *Percavirus* (pour périssodactyle et carnivore) au sein de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* (**tableau 1**). Il présente un génome de 184 kpb avec 79 ORF codant 77 protéines dont certaines présentent une forte homologie avec des protéines eucaryotes. Il a depuis été identifié dans de nombreux pays en produisant, selon les cas, des symptomatologies très variables. De rares avortements dus à HVE-2 ont aussi été rapportés. Des épidémies sévères, associées à des signes respiratoires, ont surtout été décrites chez les jeunes chevaux, conséquence possible d'une contamination précoce des foals, même en présence d'anticorps d'origine maternelle. La transmission horizontale du virus semble s'effectuer *via* la muqueuse nasale ou conjonctivale (Borchers *et al.* 2006b).

L'HVE-5 fut historiquement isolé à partir d'un échantillon de muqueuse respiratoire lors de la mise en quarantaine de chevaux importés en Australie, puis à partir de globules blancs et de liquides broncho-alvéolaires de chevaux aux États-Unis et en Europe (Fortier *et al.* 2009a). Il possède un génome de 179 kpb et présente une homologie de 60% avec celui d'HVE 2, tant au niveau des nucléotides que des acides aminés. Ce virus a depuis été décrit sur tous les continents et a récemment été associé au syndrome de fibrose multi-nodulaire pulmonaire (SFMP) chez le cheval. Il a été aussi décelé dans des situations très diverses, d'élevage ou d'entraînement, sans être associé clairement à un ou plusieurs syndromes particuliers en dehors du SFMP (Bell *et al.* 2006).

Les deux virus ont une séroprévalence très élevée chez des chevaux à l'âge adulte et provoquent des manifestations cliniques communes, se cantonnant à l'apparition de signes respiratoires discrets, accompagnés de jetages nasaux peu productifs, de kératoconjunctivites ou pharyngites, de toux et/ou une apathie sans hyperthermie prononcée. Il faut penser à leur rôle

possible dans la fatigue et la contre performance chez des chevaux jeunes ou adultes où ils ont été détectés dans des écouvillons nasopharyngés, des lavages trachéaux ou broncho-alvéolaires (Fortier *et al.* 2009b). Le recours à un modèle d'infection expérimentale chez le cheval ou chez la souris par voie intra-nasale a permis de reproduire de la conjonctivite et des signes respiratoires discrets à l'aide de souche sauvage ou de la souche LK de référence (Borchers *et al.* 1998; G.Fortier, comm. pers.).

Alors que l'HVE-2 peut demeurer à l'état latent dans les lymphocytes B, les sites de l'HVE-5 ne sont pas encore connus avec certitude mais les lymphocytes circulants semblent être à minima des candidats potentiels (Borchers *et al.* 1999).

OUTILS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : INTÉRÊTS ET LIMITES

En théorie, l'ensemble des techniques d'analyse biologique peut s'appliquer à tous les herpèsvirus équins mais les laboratoires sont actuellement les plus performants dans la détection et l'identification d'HVE-1. En effet, le dépistage des autres herpèsvirus requiert les outils et le savoir-faire nécessaires ; les anticorps spécifiques indispensables au dépistage par les techniques immunologiques n'existent pas toujours et la culture de certains virus peut s'avérer difficile. Face à ces difficultés, les techniques de PCR développées ces dernières années présentent des avantages, mais leur utilisation et surtout leur interprétation doivent être réalisées en prenant en compte l'ensemble des paramètres (commémoratifs, nature de l'échantillon, type de test réalisé...). Ce sont ces dernières techniques, de plus en plus utilisées dans le diagnostic des différentes maladies et la caractérisation des virus, qui vont être présentées dans ce chapitre.

La détection des herpèsvirus équins par PCR

Les herpèsvirus équins 1 et 4

Il existe de nombreuses variantes de la technique d'amplification génique : la PCR classique, la PCR en temps réel, la RT-PCR, la PCR nichée, la PCR multiplexe, la SNP-PCR mais le principe de la méthode reste le même. Il consiste à amplifier un acide nucléique cible à l'aide d'amorces (petits brins d'ADN spécifiques du virus recherché). Cette réaction de synthèse d'ADN *in vitro* est rendue possible par l'utilisation d'une enzyme spécifique, la polymérase, et d'un appareil nommé thermocycleur. Depuis le milieu des années 1990, une nouvelle génération d'appareils a ouvert de nouvelles perspectives: la PCR en temps réel a permis la détection des agents pathogènes par des approches quantitatives et l'identification de souches à l'aide de sondes moléculaires, parmi lesquelles les sondes *Taqman* sont les plus utilisées. Des méthodes d'amplification avec détection par des intercalants de l'ADN comme le *SyberGreen* sont éga-

(3) <http://www.hblb.org.uk/>

COMMUNICATION

lement très développées. Depuis les premiers tests de PCR décrits pour la détection d'HVE-1, pas moins d'une vingtaine de tests dirigés contre différentes cibles (gènes codant les glycoprotéines B, C, D, H, gp13, la polymérase, ...) ont permis d'identifier la présence de l'HVE-1 dans différents prélèvements biologiques tels que les tissus, les liquides de lavage trachéaux ou bronchoalvéolaires, le sang ou le liquide céphalorachidien (Ballagi-Pordany *et al.* 1990). La détection d'HVE-1 et d'HVE-4 peut être aussi réalisée de façon simultanée (Kirisawa *et al.* 1993). Les techniques de PCR assurent une détection des virus en 24 à 48 heures, plus rapide que les quatre à huit jours requis par les techniques de culture cellulaire. Leur sensibilité, leur spécificité et leur rapidité ont été aussi améliorées (Diallo *et al.* 2007). Elles sont applicables sur tous types de prélèvements, mais nécessitent de la part des laboratoires une bonne expérience de l'ensemble des étapes, de l'extraction des acides nucléiques à leur amplification, dans des conditions bien maîtrisées. La PCR en temps réel assure une approche quantitative. Par exemple, elle a permis la mise en évidence d'une probable relation entre la charge d'un prélèvement en HVE-1 et HVE-4 et les manifestations cliniques lors d'infections par ces virus. Une différence de sept log₁₀ (nombre de particules virales / g de tissu) a été montrée entre la concentration de particules d'HVE-1 dans des poumons d'avortons et celle dans les ganglions trijumeaux de chevaux adultes cliniquement « sains » (Pronost *et al.* 2005). Une notion de seuil a été proposée : au-dessus d'un seuil de 10⁶ copies de DNA par 10⁶ cellules dans des échantillons provenant du nasopharynx, le virus HVE-4 se trouve probablement sous sa forme infectieuse et non latente (Pusterla *et al.* 2005). Des résultats identiques ont été obtenus pour l'herpèsvirus 1 à partir de prélèvements sanguins et nasopharyngés (Pusterla *et al.* 2009). Les herpèsvirus constituent un cas particulier du fait de leur possible état de latence et si un simple test par PCR ciblant le gène codant la glycoprotéine B (glycoprotéine de surface jouant un rôle dans la pénétration cellulaire et la propagation cellule à cellule) peut donner un résultat sur la présence ou l'absence du virus, plusieurs tests de PCR (la PCR ciblant l'ADN mais surtout la RT-PCR ciblant les ARNs et en particulier les LATs) sont nécessaires pour caractériser l'état infectieux ou latent du virus. À l'avenir, les techniques de PCR fourniront de plus en plus de résultats quantitatifs ; une nécessaire harmonisation entre les laboratoires pour pouvoir comparer les données, la mise sous assurance qualité (de la phase de développement des méthodes à leur suivi dans le temps, pour assurer la fiabilité des résultats) sont des étapes préalables à une utilisation raisonnée de ces outils.

L'herpèsvirus équin 3

Les premiers tests de PCR pour la détection de l'HVE-3 sont apparus au début des années 2000. Tests conventionnels, ils avaient pour cible les quelques gènes connus de ce virus, essentiellement ceux codant la glycoprotéine G et l'ADN polymérase. Des tests de PCR en temps réel ont ensuite permis les premiers suivis quantitatifs de la charge virale dans les temps (Barrandeguy *et al.* 2008 ; S A Brau, comm. pers.).

Les Gammaherpesvirinae : HVE-2 et HVE-5

Les tests de PCR mis au point pour détecter HVE-2 et HVE-5 reposent sur une meilleure connaissance de la structure de leur génome. Ils ciblent les gènes codant les glycoprotéines B et H et l'IL-10 like. Ils tiennent compte de la grande hétérogénéité des souches, contrairement à ce qui est observé pour les alpha-herpèsvirus et certains permettent une détection simultanée des gamma-herpèsvirus équins (Torfason *et al.* 2008). Un test dit de « PCR consensus » a également été largement utilisé pour la détection à la fois de ces virus et des alpha-herpèsvirus. Il cible une région variable du gène de la DNA polymérase et permet la détection des nombreux herpèsvirus présents chez l'ensemble des mammifères (Van Devanter *et al.* 1996 ; Léon *et al.* 2008).

Le typage des souches des différents herpèsvirus équins

L'herpèsvirus équin 1

Le potentiel pathogène des souches incriminées peut également jouer un rôle important dans le développement des signes cliniques au cours des affections neurologiques, respiratoires ou des avortements. Les études sur la diversité des souches ont été réalisées selon deux approches, par digestion enzymatique (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) au cours des années 1980 et plus récemment, par comparaison des génomes complets.

Diversité des souches d'HVE-1 par analyse RFLP

La première étude de typage sur un nombre significatif de souches d'HVE-1, réalisée par Allen *et al.* (1985), a permis, après digestion de l'ADN viral par cinq enzymes de restriction (*Bam*HI, *Eco*RI, *Bgl*II, *Sal*I et *Sst*I), de mettre en évidence deux sous-types d'HVE-1 à partir de 297 souches issues de 172 épisodes cliniques différents (148 avortements et 24 épisodes respiratoires). Les sous-types 1 et 2 comprenaient respectivement 16 et 13 profils différents. Deux profils, nommés « EHV-1 P » et « EHV-1 B », représentaient 90% des souches analysées. « EHV-1 P » était identifié majoritairement chez les souches abortives isolées entre 1960 et 1980 aux États-Unis. Dès cette époque, Georges Allen avait alerté sur les limites de ces critères de classification. À partir de 1981, le profil « EHV-1 B » sera retrouvé dans la plupart des cas.

Approche par comparaison des génomes complets

La méthode consiste à comparer la séquence complète de deux virus HVE-1 issus d'animaux ayant présenté des signes cliniques différents (Nugent *et al.* 2006). Les souches Ab4 (AY665713) et V592 (AY464052) d'HVE-1 ont été isolées chez des chevaux ayant présenté seulement soit des symptômes neurologiques, soit des symptômes respiratoires. La comparaison de leurs génomes a montré 0,1% de divergence avec 50 régions présentant soit des délétions, soit des insertions d'un ou de plusieurs nucléotides. Cent dix SNP (*Single Nucleotide*

Polymorphism) ont été détectés, dont 43 présentaient un changement d'acide aminé. L'expression de ces différences a été ensuite recherchée dans une population de 131 souches d'HVE-1 : une mutation de la base 2254 du gène codant l'ADN polymérase, se traduisant par le remplacement d'une adénine (A₂₂₅₄) par une guanine (G₂₂₅₄), était associée de manière significative aux souches provenant d'épisodes neurologiques ($p < 0.0001$), alors que la base A₂₂₅₄ était associée aux épisodes abortifs ne présentant aucun cas de forme clinique neurologique. Les souches porteuses de la base G₂₂₅₄ correspondant à l'acide aspartique (D) en position 752 ont été appelées formes mutantes ou souches paralytiques. Celles porteuses de la base A₂₂₅₄ correspondant à l'asparagine (N) ont été dénommées formes sauvages ou souches abortives. Sur ces 131 souches en provenance de tous les continents, 95% (78/82) des souches responsables d'épisodes autres que neurologiques possédaient la base A₂₂₅₄ sur l'ORF30 ; 86% (42/49) des souches liées à des épisodes neurologiques possédaient la base G₂₂₅₄ (Nugent *et al.* 2006).

Études expérimentales confirmant l'intérêt de la mutation G/A en position 2254

Pour confirmer le rôle potentiel de cette mutation, deux infections expérimentales ont été réalisées chez des poneys et des chevaux à partir des deux types de souches d'HVE-1 : la souche paralytique Ab4 (D₇₅₂) et une souche mutante N₇₅₂ construite à partir de la souche Ab4 par mutagenèse dirigée (Goodman *et al.* 2007). Le remplacement de la base 2254 (G₂₂₅₄/A₂₂₅₄) a conduit au remplacement de l'acide aspartique D par l'asparagine N en gardant l'avantage de conserver le reste du génome identique. Le mutant N₇₅₂ n'entraînait pas de signes neurologiques chez les chevaux infectés, alors que la souche D₇₅₂ était capable de provoquer une ataxie avec une réaction inflammatoire dans le système nerveux central (méninges et partie thoracique de la moelle épinière). Si les résultats concernant l'amplitude et la durée de la virémie étaient significatifs, les auteurs ont néanmoins souligné que seulement deux chevaux sur sept avaient présenté des signes cliniques d'intensité modérée.

En 2009, le même type d'expérience a été réalisé à partir d'une souche non neuropathogène (NY03) qui a subi une mutation (A₂₂₅₄/G₂₂₅₄). L'infection par cette souche « NY03 mutée » a provoqué l'apparition de signes neurologiques chez deux chevaux sur six ; elle a entraîné la mort de l'un des deux. Les signes présentés par le second étaient modérés et celui-ci a récupéré au bout de neuf jours (Van de Walle *et al.* 2009). Si la mutation était suffisante pour conduire des chevaux à la mort par EMH, il est difficile de reproduire les signes cliniques de façon expérimentale (Goerhing *et al.* 2010), ce qui souligne l'importance des autres parties du génome dans ce type d'expérimentations.

Études de typages réalisées « sur le terrain »

Nous avons nous-mêmes analysé le génome de 125 souches d'HVE-1 ; elles étaient responsables de cas d'EMH pour 16 d'entre elles, de cas d'atteintes respiratoires pour 24 et d'avor-

tements pour 85 (Pronost *et al.* 2010a). Le génotype G2254 a été identifié dans 30 de ces souches (24%) dont sept étaient en relation avec des signes d'EMH, une avec une atteinte respiratoire et 22 avec des avortements. Les sept cas d'EMH ont été diagnostiqués au cours de deux épisodes recensés en 2009 et des euthanasies ont été pratiquées, le pronostic vital étant engagé. Ces souches étaient vraisemblablement plus virulentes que celles identifiées lors des infections par HVE-1 d'avant 2009. Des souches, dites paralytiques, peuvent être ainsi détectées dans les formes abortives de l'infection virale et inversement, des souches qui ne sont pas supposées affecter le système nerveux sont aussi responsables de formes paralytiques. Ces résultats ont été confirmés aux États-Unis, en Argentine ou en Allemagne (Pronost *et al.* 2010b). Cependant, depuis cette étude, les cas d'EHM que nous avons analysés ont tous été dus à des souches de type paralytique.

Le typage des souches reste utile sur le terrain, car il permet d'apprécier le risque qui est accru en présence d'une souche paralytique et utile au laboratoire de recherche car il permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la pathologie.

Les autres herpesvirus équins

Diversité des souches d'HVE-3

Comme cela a été souligné précédemment, seuls quelques fragments du génome d'HVE-3 sont connus et aucune souche n'a encore été totalement séquencée comme cela est le cas pour HVE-1 et HVE-4. Un fragment de 1344 pb du gène codant la glycoprotéine G (gG) et présentant aussi bien des zones conservées que des zones variables a été ciblé pour réaliser la caractérisation de 25 souches issues de différentes épizooties en Argentine. Trois substitutions nucléotidiques ont été identifiées dans le gène gG aux positions 904, 1103 et 1264, ce qui a permis de définir différents types de souches en fonction des codons obtenus : codon de type CAT (Australie), AAT (États-Unis et Brésil), CAG (Argentine) et ACT (Argentine) (Barrandeguy 2010).

Ce travail de typage a été complété par l'analyse des profils obtenus par digestion par des endonucléases de restriction. Parmi les 25 isolats étudiés, différents profils de restriction ont été observés : deux avec *Bam*HI, deux avec *Hind* III et un avec *Eco* RI. Les profils de restriction et les séquences nucléotidiques du gène gG obtenus ont montré que différents types de souches d'HVE 3 circulaient en Argentine. Il n'a pas été observé de co-circulation de souches lors des différents épisodes, contrairement à ce qui est décrit pour HVE-1 et surtout pour les gamma-herpesvirus équins (Barrandeguy 2010).

Diversité des souches d'HVE 2 et d'HVE 5

Il existe une grande variété de séquences parmi les souches d'HVE-2 et un même animal peut être infecté de façon concomitante par plusieurs souches. Holloway *et al.* (2000) se sont intéressés à une séquence présente dans la partie N terminal de

COMMUNICATION

la glycoprotéine B et ont déterminé deux sites I et II présentant des zones hypervariables, dans les zones du gène codant respectivement les acides aminés 28 à 50 et 130 à 165 de la glycoprotéine B. Plus récemment, Brault *et al.* (2010) ont mis en évidence une nouvelle zone de ségrégation dans la zone de ce gène codant les acides aminés 230 à 270. Ils ont mis en évidence dans cette région jusqu'à 12 clones chez un même poulain, sans pour autant établir de corrélation entre le type de souche incriminée ou la charge virale détectée et les signes cliniques observés. La présence de variants identiques dans un même élevage suggère une transmission horizontale entre les foals. La plus grande diversité de souches a été observée chez les animaux âgés de trois mois.

D'autres fragments du génome ont été retenus, comme ceux contenant les gènes codant la glycoprotéine H, l'IL10 homologue et ceux du cadre de lecture ORF74, pour réaliser ces études de phylogénie (Holloway *et al.* 2000 ; Sharp *et al.* 2007 ; Brault *et al.* 2011). Aucune étude n'a été cependant réalisée sur des fragments de taille supérieure à 1500 pb, et l'on peut penser que les nouvelles techniques de séquençage (NGS) ouvriront la voie à de nouvelles pistes d'investigation sur ces virus dont tout le monde s'accorde à dire qu'ils présentent une grande variabilité.

Une grande variabilité des souches d'HVE-5 a également été montrée par séquençage du gène codant la glycoprotéine B et des études de RFLP (Dunowska *et al.* 2000).

CONCLUSION

Les herpesvirus équins montrent une hétérogénéité tant dans leurs propriétés intrinsèques que dans les signes cliniques des infections qu'ils génèrent. L'HVE-1 entraîne les conséquences économiques les plus importantes pour la filière. Si son implication dans les avortements est bien connue, les dernières crises de myéloencéphalopathie décrites sur les différents continents conduisent actuellement à un renforcement des mesures de lutte contre ce virus. L'utilisation accrue des méthodes de PCR à partir

de prélèvements nasal et sanguin lors de suspicion d'EHEM a certainement contribué à limiter la dissémination du virus. Les travaux réalisés en Argentine sur HVE-3 ont montré pour la première fois le phénomène de latence chez ce virus et sa possible dissémination par les voies respiratoires. Les infections expérimentales réalisées par HVE-2 reproduisent les signes observés en clinique et cette identité montre que ce virus est bien impliqué dans les formes respiratoires, même si celles-ci sont qualifiées de subcliniques ou de pathologies de l'effort. Si l'HVE-4, virus de la rhinopneumonie est bien identifié, il est très certainement avec HVE-5 le moins étudié actuellement.

Les techniques de génétique moléculaire développées ces dernières années ont permis de réaliser des progrès dans le domaine de la détection de tous les herpesvirus équins. Le progrès dans les méthodes quantitatives, permettant de les utiliser en routine, constitue le défi des années à venir. Elles apporteraient en particulier des possibilités d'évaluation de l'état de latence d'un virus et de détecter les porteurs sains. Des études de typage, actuellement en cours dans différents laboratoires, montrent que, contrairement à d'autres virus comme ceux de l'artérite virale équine ou la grippe équine, la connaissance du génome des divers herpesvirus équins est encore insuffisante pour réaliser des études épidémiologiques pertinentes. Concernant l'HVE-1, seules les séquences complètes des virus Ab4 et V592 sont accessibles sur GenBank. Fukushi *et al.* (2009) ont présenté des résultats préliminaires montrant que quatre nouvelles séquences (souches 89c25, 90c16, 00c19 et pFL06) seraient prochainement accessibles. Les méthodes de séquençage de nouvelle génération et en particulier, la méthode de piroséquençage, devraient permettre d'avoir accès à un grand nombre de séquences dans un avenir proche. Elles rendent très rapidement accessible le séquençage de génomes viraux complets et le défi résidera certainement dans la bonne adéquation entre la souche HVE-1 séquencée et la caractérisation sans faille de la forme clinique observée d'une part et la capacité à interpréter une quantité importante d'informations d'autre part.

REMERCIEMENTS

À tous les vétérinaires, éleveurs, propriétaires et entraîneurs qui nous confient les analyses sans lesquels nous ne pourrions développer ces programmes de recherche.

Au Conseil Général du Calvados et au Pôle de Compétitivité Filière Équine pour leur soutien permanent à la filière.

Au Dr François Valon pour son soutien tout au long de la réalisation de ce travail.

Au RESPE pour les échanges fructueux lors des différentes épi-zooties.

BIBLIOGRAPHIE

- Agius, C.T. & Studdert, M.J. 1994. Equine herpesviruses 2 and 5: comparisons with other members of the subfamily gammaherpesvirinae. *Advances in Virus Research* 44: 357-379.
- Allen, G.P., Yeargan, M.R., Turtinen, L.W., Bryans, J.T. 1985. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus-1) among Kentucky horses. *Am J Vet Res.* 46: 138-140.
- Allen, G.P. & Bryans, J.T. 1986. Molecular epidemiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *IVIS* 2: 78-144.
- Ballagi-Pordany, A., Klingeborn, B., Flensburg, J., Belak, S. 1990. Equine herpesvirus type 1: detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 22: 373-381.
- Barrandeguy, M., 2010. *Virological aspects and pathogenesis of natural and experimental equid herpesvirus 3 infection in horses*. Thesis D/2010/0480/14 ISBN 978-2-930404-79-0 Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège. 89 pages.
- Barrandeguy, M. & Thiry, E. 2011. Equine coital exanthema and its potential economic

- implications for the equine industry. *Vet J.* (in press).
- Barrandeguy, M., Vissani, A., Olguin, C., Miño, S., Pereda, A., Oriol, J., Thiry, E. 2008. Experimental reactivation of equine herpesvirus-3 following corticosteroid treatment. *Equine Vet J.* 40: 593–595.
 - Barrandeguy, M., Ulloa, N., Bok, K., Fernandez, F. 2010a. Outbreak of rhinitis caused by equid herpesvirus 3. *Vet Record* 166: 178.
 - Barrandeguy, M., Perkins, J., MacDonough, J., Vissani, A., Olguin Perglione, C., Thiry, E., 2010b. Occurrence of equine coital exanthema in mares from an embryo transfer center. *J. Equine Vet Science* 30: 145–149.
 - Barrandeguy, M., Vissani, A., Pont Lezica, F., Salamone, J., Heguy, A., Becerra, L., Olguin Perglione, C., Thiry, E., 2010c. Subclinical infection and periodic shedding of equid herpesvirus 3. *Theriogenology* 74: 576–580.
 - Bell, S.A., Balasuriya, U.B., Nordhausen, R.W., MacLachlan, N.J., 2006. Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *J Vet Diagn Invest.* 18: 472–475.
 - Borchers, K., Thein, R., Sterner-Kock, A. 2006a. Pathogenesis of equine herpesvirus associated neurological disease: a revised explanation. *Equine Vet J.* 38: 283–287.
 - Borchers, K., Ebert, M., Fetsch, A., Hammond, T., Sterner-Kock, A. 2006b. Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Vet Microbiol.* 118: 260–266.
 - Borchers, K., Wolfinger, U., Ludwig, H., Thein, P., Baxi, S., Field, H.J., Slater, J.D. 1998. Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Research* 55: 101–106.
 - Borchers, K., Wolfinger, U., Ludwig, H. 1999. Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. *J. Gen Virol.* 80: 2165–2171.
 - Brault, S.A., Bird, B.H., Balasuriya, U.B.R., MacLachlan, N.J. 2011. Genetic heterogeneity and variation in viral load during equid herpesvirus-2 infection of foals *Vet Microbiol.* 147: 253–261.
 - Burrows R & Goodridge D 1984. Studies of persistent and latent equid herpesvirus 1 and herpesvirus 3 infections in the Pirbright pony herd. In *Latent herpesvirus infections in veterinary medicine* (ed.G.Wittmann, R.M. Gaskell and H.J. Rziha), pp.307-319. Martinus Nijhoff, Boston.
 - Crabb, B.S. & Studdert, M.J. 1995. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Virus Res.* 45: 153-190.
 - Chaffaux S., Dugardin D., Pitel P.H., Hendrikx P., Laugier C., Valon F. 2011. Premier bilan du réseau d'épidémiosurveillance des avortements infectieux et contagieux chez les équidés. *Bull Acad Vét France.* 164(2):111-118.
 - Diallo, I.S., Hewitson, G., Wright, L.L., Kelly, M.A., Rodwell, B.J., Corney, B.G. 2007. Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet Microbiol.* 123: 93-103.
 - Dunowska, M., Holloway, S.A., Wilks, C.R., Meers, J. 2000. Genomic variability of equine herpesvirus-5. *Arch Virol.* 145 (7):1359-1371.
 - Fortier, G., Pitel, P.H., Maillard, K., Pronost, S. 2003. Herpès virus en pathologie équine : connaissances actuelles et perspectives. *Bull Acad Vét France* 156(2):13-24.
 - Fortier, G., Pronost, S., Miszczak, F., Fortier, C., Léon, A., Richard, E., Van Erck, E., Thiry, E., Lekeux, P. 2009a. Identification of equid herpesvirus 5 in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples from 2006 to 2007. *Vet J.* 182 (2):346-348.
 - Fortier, G., Van Erck, E., Fortier, C., Richard, E., Pottier, D., Pronost, S., Miszczak, F., Thiry, E., Lekeux, P. 2009b. Herpes virus in respiratory liquids of horse: putative implication in airway inflammation and association with cytological features. *Vet Microbiol.* 139(1-2):34-41.
 - Fortier, G., Van Erck, E., Pronost, S., Lekeux, P., Thiry, E. 2010. Equine Gamma herpesviruses: pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *Vet J.* 186: 148-156.
 - Friday, P.A., Scarratt, W.K., Elvinger, F., Timoney, P.J., Bonda, A. 2000. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J Vet Intern Med.* 4: 197-201.
 - Fukushi H., Tsujimura K., Matsumura T., Osterrieder K. 2009. Genome sequence analysis of Equine Herpesvirus 1 isolates: sequence based differences in neurovirulence with additional information. In *Proceedings of the 3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Greifswald, April 22-24, 2009, V28. Friedrich Loeffler Institut, Greifswald. Germany)
 - Goehring, L.S., Van Winden, S.C., Van, M.C., Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M. 2006. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003). *J Vet Intern Med.* 20: 601-607.
 - Goehring, L.S., Van, M.C., Berendsen, M., Cullinane, A., De Groot, R.J., Rottier, P.J., Wesselingh, J.J., Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M. 2010. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. *Vet J.* 186: 180-7.
 - Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palu, G., Smith, K.C., Osterrieder, N., Davis-Poynter, N. 2007. A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* 3: e160.
 - Hasebe, R., Kimura, T., Sato, E., Okazaki, K., Ochiai, K., Wada, R., Umamura, T. 2002. Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. *J Comp Pathol.* 127:118-125.
 - Holloway, S.A., Lindquister, G.J., Studdert, M.J., Drummer, H.E., 2000. Analysis of equine herpesvirus 2 strain variation using monoclonal antibodies to glycoprotein B. *Arch Virol.* 145: 1699–1713.
 - Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C. 2007. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J Vet Intern Med.* 21: 157-165.
 - Kirisawa, R., Endo, A., Iwai, H., Kawakami, Y. 1993. Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 36: 57-67.
 - Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J., Mumford, J.A. 1994. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J.* 26: 470-473.
 - Laugier C., Foucher N., Sevin C., Léon A., Tapprest J. 2011. A 24-year retrospective study of equine abortion in Normandy (France). *Journal of Equine Veterinary Science.* 31: 116–123.
 - Léon, A., Fortier, G., Fortier, C., Freymuth, F., Tapprest, J., Leclercq, R., Pronost, S. 2008. Detection of equine herpesviruses in aborted fetuses by consensus PCR. *Vet Microbiol.* 126: 20–29.
 - Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G. 2009. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med.* 23: 450-461.
 - Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N. 2006. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J Virol.* 80: 4047-4060.
 - Paillot, R., Sharp, E., Case, R., Nugent, J. 2009. Herpes virus infection in equid species. In *Herpesviridae: Viral Structure, Life Cycle and Infection* (ed.T.R.Gluckman), pp.17-86. Novasciences Publishers. ISBN 978-1-60692-947-6.

COMMUNICATION

- Perdue, M.L., Kemp, M.C., Randall, C.C., O'callaghan, D.J. 1974. Studies of the molecular anatomy of the L-M cell strain of equine herpes virus type 1: proteins of the nucleocapsid and intact virion. *Virology* 59: 201-216.
- Pronost, S., Gouarin, S., Léon, A., Miszczak, F., Laugier, C., Couroucé-Malblanc, A., Fortier, G., Freymuth, F. 2005. The development of a real-time polymerase chain reaction assay for differentiation of EHV-1 acute or latent infection in tissue. In *Proceeding of the XIth SIVE (Società Italiana Veterinari per Equini) International Congress*, Pise (Italy) p. 51.
- Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Miszczak, F., Freymuth, F., Fortier, G. 2010a. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Vet Microbiol.* 145: 329-333.
- Pronost, S., Cook, R., Fortier, G., Timoney, P., Balasuriya, U. 2010b. Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Vet J.* 42(8):672-674.
- Pusterla, N. & Mapes, S. 2008. Evaluation of an air tester for the sampling of aerosolised equine herpesvirus type 1. *Vet Rec.* 163(10): 306-308.
- Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Wilson, W.D., Watson, J.L., Ferraro, G.L., Madigan, J.E. 2005. Equine herpesvirus-4 kinetics in peripheral blood leukocytes and nasopharyngeal secretions in foals using quantitative real-time TaqMan PCR. *J Vet Diag Invest.* 17: 578-581.
- Pusterla, N., Wilson, W.D., Mapes, S., Finno, C., Isbell, D., Arthur, R.M., Ferraro, G.L. 2009. Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California. *Vet J.* 179: 230-239.
- Saxegaard, F. 1966. Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. *Nord. Vet Med.* 18 : 504-510.
- Sharp, E.L., Farrell, H.E., Borchers, K., Holmes, E.C., Davis-Poynter, N.J., 2007. Sequence analysis of the equid herpesvirus 2 chemokine receptor homologues E1, ORF74 and E6 demonstrates high sequence divergence between field isolates. *J Gen Virol.* 88: 2450-2462.
- Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M. 1994. Field H.J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol.* 75 (8): 2007-2016.
- Slater, J.D., Lunn, D.P., Horohov, D.W., Antczak, D.F., Babiuk, L., Breathnach, C., Chang, Y.W., Davis-Poynter, N., Edington, N., Ellis, S. et al. 2006. Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Vet Immunol Immunopathol.* 111: 3-13.
- Telford, E.A., Watson, M.S., McBride, K., Davison, A.J. 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189: 304-316.
- Thiry, E., 2006. Exanthème coïtal équin. In *Virologie Clinique des équidés. Maladies Virales de la Reproduction et du Nouveau-né.* pp. 59-61. Les Éditions du Point Vétérinaire, Wolters Kluwer, France,
- Torfason, E.G., Thorsteinsdottir, L., Torsteinsdottir, S., Svansson, V., 2008. Study of equid herpesviruses 2 and 5 in Iceland with a type-specific polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 85: 605-611.
- VanDevanter, D.R., Warrenner, P., Bennett, L., Schultz, E.R., Coulter, S., Garber, R.L., Rose, T.M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol.* 34: 1666-1671.
- Van De Walle, G.R., Goupil, R., Wishon, C., Damiani, A., Perkins, G.A., Osterrieder, N. A. 2009. Single-nucleotide polymorphism in a herpesvirus DNA polymerase is sufficient to cause lethal neurological disease. *J Infect Dis.* 200: 20-25.